

Untersuchungen über das Proliferationsverhalten
des lymphoretikulären Gewebes der Ratte
nach Zytostatika-Behandlung
mit ^3H -markiertem Thymidin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christa Otto geb. Weise
aus Leipzig

Marburg 1967

Untersuchungen über das Proliferationsverhalten
des lymphoretikulären Gewebes der Ratte
nach Zytostatika-Behandlung
mit ^3H -markiertem Thymidin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christa Otto geb. Weise

aus Leipzig

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am : 14. Dezember 1967.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof.Dr.med. R. Siegert

Referent: Prof.Dr.med. Dr.rer.nat. E.H. Graul

Correferent : Doz.Dr.agr. E. Schaumlöffel

Untersuchungen über das Proliferationsverhalten
des lymphoretikulären Gewebes der Ratte nach
Zytostatika-Behandlung mit ^3H -markiertem Thymidin.

I n h a l t

	<u>Seite</u>
A. Einführung	1
I. Problemstellung	
II. Über den Stoffwechsel von ^3H -Thymidin und spezifische Probleme bei der Anwendung als Indikator der Zell- proliferation.	3
III. Wirkungsweise und Dosierung von Endoxan.	9
B. Experimenteller Teil	
I. Methodik und Versuchsanstellung	
a) Planung und Durchführung der Versuche	12
b) Gesamtaktivitätsbestimmungen	14
c) Autoradiographie	16
II. Versuchsergebnisse	18
C. Besprechung der Ergebnisse	36
D. Zusammenfassung	45
E. Literatur	47

A. Einführung

I. Problemstellung

Zytostatika werden in der Carcinom-Therapie und Prophylaxe seit mehreren Jahren angewandt. Sie wirken nicht spezifisch auf die Tumorzellen, sondern auf alle schnell proliferierenden Gewebe, wodurch der Chemotherapie die entsprechenden Grenzen gesetzt sind (BROCK 1960, STENDER 1961, GROSS 1964, SCHUMACHER 1964).

In Untersuchungen mit ^3H -Thymidin stellten PALME und LISS (1963) bei der Maus eine Hemmung der DNS-Biosynthese in proliferierenden Zellsystemen (Plattenepithel der Zunge, Dünndarmepithel, rote Milzpulpa) als Folge einer einmaligen hochdosierten Endoxangabe (250 mg/kg) fest. Bei einer niedrigen Dosis des Zytostatikums von 30 mg/kg beobachteten die Autoren nur noch in der roten Milzpulpa einen deutlichen Effekt auf den ^3H -Thymidin-Einbau (PALME 1963). Weiterhin wurde von LISS (1964) in Versuchen mit ^{32}P gezeigt, daß 24 Stunden nach Endoxangabe (68 mg/kg) die ^{32}P -Einbaurate der Milz um 50 % gegenüber den Kontrollen gesenkt war. In Übereinstimmung mit Befunden von STENDER et al. (1961) wird von POTEL u. BROCK (1965) berichtet, daß Endoxan bei der Ratte eine Hemmung der spezifischen Antikörperbildung auf Brucella-Antigene sowie eine Verminderung der Leukozytenzahlen im peripheren Blut und der Plasmazellen in der Milz bewirkte. Nach einem Zeitraum von 16-18 Tagen wurde ein Anstieg der Leukozyten und Plasmazellen sowie der spezifischen Antikörper zu Werten beobachtet, die denen der Kontrollen entsprachen.

Im Folgenden wird über Ergebnisse experimenteller Untersuchungen berichtet, die sich mit der Wirkung von Cyclophosphamid (Endoxan ^(R); Asta-Werke) auf das lymphoretikuläre Gewebe der Ratte befaßten.

Das lymphoretikuläre Gewebe von Milz und Lymphknoten gilt neben dem Thymus als Bildungsstätte der Lymphozyten (STENDER 1963). Es zeichnet sich durch eine besonders lebhaft^e Zellneubildung aus und reagiert dadurch entsprechend empfindlich auf Zytostatika. Außerdem ist das lymphoretikuläre System Ort der Antikörpersynthese. Antigene verursachen vor allem in der Milz und in den Lymphknoten eine gesteigerte DNS-Synthese und eine vermehrte Bildung von Plasmazellen (STENDER 1964).

Mit Hilfe von Tritium-markiertem Thymidin wurde das Proliferationsverhalten im Thymus und im lymphoretikulären Gewebe von Milz und Lymphknoten nach einmaliger Endoxanapplikation durch Bestimmung der relativen spezifischen Aktivitäten und durch autoradiographische Präparate untersucht, wobei besonders die folgenden Fragestellungen interessierten:

- 1.) Das Proliferationsverhalten des lymphoretikulären Gewebes zu verschiedenen Zeiten nach Endoxangabe.
- 2.) Die Zellproliferation in Milz, Thymus und Lymphknoten nach Endoxanapplikation und anschließender einmaliger Brucella-Antigen-Injektion.

II. Über den Stoffwechsel von ^3H -Thymidin und spezifische Probleme bei der Anwendung als Indikator der Zellproliferation

Zum Studium der Zellproliferation eignet sich am besten Thymidin, ein Nucleosid der Pyrimidinbase Thymin. Die Generationszeit von intermitotischen Zellen gliedert sich in 3 Phasen:

- 1.) In der G_1 -Phase erfolgt nach der Zellteilung Wachstum und Ausdifferenzierung der Zelle. Je nach Zellart kann diese Phase Stunden bis Monate dauern.
- 2.) Die S (DNS-Synthese)-Phase ist die Vorbereitung der Zelle auf die nächste Mitose (Karyokinese). Durch Neubildung von Desoxyribonucleinsäure (DNS) wird der Chromosomensatz verdoppelt. Die DNS-Synthesezeit beträgt 6-10 Stunden.

3.) Unter der G_2 -Phase versteht man das präkaryokinetische Intervall zwischen der DNS-Verdoppelung und dem Beginn der Karyokinese (GRUNDMANN 1964, OEHLERT 1964).

Das Nucleosid Thymidin wird während der S-Phase in die DNS des Zellkerns eingebaut. Wird es mit den Radionukliden ^3H bzw. ^{14}C markiert, so können durch das autoradiographische Nachweisverfahren diejenigen Zellen gekennzeichnet werden, die sich in der S-Phase befinden. Aus dem prozentualen Verhältnis von radioaktiv-markierten Zellen zu nicht markierten Zellen ergibt sich der sog. Thymidin-Index. Da die DNS Synthese der Mitose vorausgeht, erhält man durch diesen Index ein Bild vom Proliferationsausmaß des interessierenden Gewebes (HUGHES 1958, VERLEY 1958).

Die Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und Cytosin stellen zusammen mit den Purinbasen Adenin, Guanin und Hypoxanthin die Hauptbestandteile der Desoxyribonucleinsäure dar (KARLSON 1964).

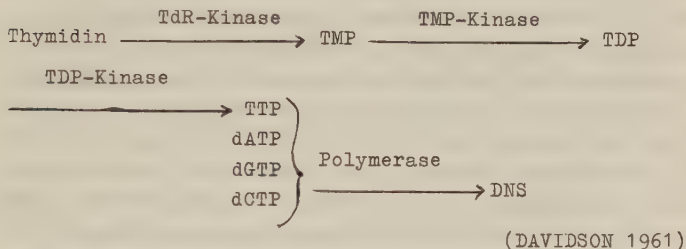
1954 konstruierten WATSON und CRICK ein Modell für das fadenförmige DNS-Molekül. Danach wird der Molekülfaden von zwei spiralg ineinander geschraubten Polynucleotidketten gebildet, deren Basen innerhalb der Doppelspirale aufeinander zugerichtet und durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Die jeweiligen Basenpaare sind Adenin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin (WEIDEL 1959).

1960 gelang es KORNBERG aus Extrakten von *Escherichia coli* das Enzym "Polymerase" zu isolieren. Mit diesem Enzym gelang es ihm, aus den 5'-Triphosphaten von Desoxy-Thyminidin, -guanosin, -cytidin und -adenosin unter Abspaltung von Pyrophosphat, DNS zu synthetisieren, wobei ihm eine kleine Menge DNS als "Starter" für die Reaktion diente (HOLLEMAN-RICHTER 1960, GRUNDMANN 1964).

Thyminidin wird nach Injektion durch den Blutstrom verteilt und in die DNS jener Zellen eingebaut, die sich in dem geeigneten metabolischen Zustand befinden (PELC 1965).

Thyminidin kommt normalerweise nicht als Vorstufe des Thymins in Betracht; denn die Bildung des Thymins vollzieht sich über Uridin und Uridin-5'-monophosphat in Thyminidin-5'-monophosphat (DAVIDSON 1961). Da Thyminidin (TdR) jedoch ebenfalls in Thyminidin-5'-monophosphat (TMP) umgewandelt wird, gelangt es dadurch auf dem normalen Stoffwechselweg in die DNS. In mehreren Versuchen konnte bewiesen werden, daß dem Einbau von Thyminidin in die DNS die Umwandlung in Thyminidin-5'-triphosphat (TTP) vorausgeht (SMELLIE 1959, WEISSMAN 1960). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Phosphorylierung von Thyminidin in TMP, TDP und TTP durch drei Enzyme in Gegenwart von Mg^{++} und einer größeren Menge Adenosintriphosphat durchgeführt wird

(WEISSMAN 1960). Ferner bewirkt das Enzym Polymerase den Einbau von TTP in die DNS in Gegenwart von Desoxyadenosin (dATP), Desoxyguanosin (dGTP), Desoxycytidin (dCTP) und einer Starter-DNS (BOLLUM 1959, WEISSMAN 1960).



Versuche mit katabolischen Enzymen ließen erkennen, daß injiziertes markiertes Thymidin in die DNS nicht am Ende von Polynucleotidketten, sondern in neusynthetisierte Ketten eingebaut wird (SMELLIE 1960).

Weiterhin wurde der lösliche Nucleotid-Pool der Thymidin-Derivate untersucht, der im Zellkern lokalisiert ist (JACOBSON 1964, STONE 1965). Thymidin kann in diesen Pool nur während der S-Phase aufgenommen werden (JACOBSON 1964, STONE 1965, CLEAVER 1965). Wie autoradiographische Untersuchungen zeigen konnten, besteht der Pool vom Abschluß einer S-Phase bis zum Beginn der nächsten (STONE 1965). Durch Papierchromatographie wurden in diesem Nucleotidpool sechs radioaktive Zonen gefunden, wovon drei TMP, TDP, TTP und eine Thymidin entsprachen, während zwei weitere keiner dieser Verbindungen zugeordnet werden konnten (JACOBSON 1964).

Zwischen zwei S-Phasen findet in dem Thymidin-Derivat-Pool kein Stoffwechselumsatz statt (STONE 1965, CLEAVER 1965). Bei Anlauf der DNS-Synthese wird der von der vorangegangenen S-Phase gebildete Pool verwendet. Der

Pool-Umsatz stimuliert dann die Synthese von neuen phosphorylierten Vorstufen und ermöglicht auf diese Weise die Aufnahme des exogenen Thymidins in das Nucleotid-Lager. Die DNS-Synthese ist somit der Stimulator für den Umsatz des Thymidin-Derivat-Pools (STONE 1965).

Die Verfügbarkeitszeit von ^3H -Thymidin nach Injektion beträgt 40-60 Minuten. Nach dieser Zeit ist die Konzentration des ^3H -Thymidins im Serum so weit abgefallen, daß kein autoradiographisch nachweisbarer Einbau mehr stattfindet (KOBURG 1962). Der wichtigste Faktor für das Ausmaß des Thymidineinbaues *in vivo* ist die Zellteilungsrate des Gewebes. Wachsende oder schnell proliferierende Gewebe wie Darmepithel, Knochenmark, Thymus können gegenüber anderen Geweben wie Leber und Niere einen gesteigerten Einbau verzeichnen (SMELLIE 1959, WEISSMAN 1960, DAVIDSON 1961, STEEL 1965). Gleichzeitig mit einer erhöhten Thymidin-Inkorporation ist eine vermehrte Enzymaktivität feststellbar (DAVIDSON 1961, EKER 1965).

Einen weiteren Einfluß auf die Einbaurate des mit dem Blut transportierten Thymidins hat die Größe der injizierten Dosis und ihre Zugänglichkeit zu dem intrazellulären Thymidin-Derivat-Pool. Diese Zugänglichkeit ist weitgehend von der Vaskularisation des Gewebes abhängig (STEEL 1965).

Bei sich schnell erneuernden Geweben mit kurzer zellulärer Umsatzzeit und hoher ^3H -Thymidinaufnahme erfolgt der Abbau ^3H -markierter DNS gleichfalls schneller als bei Geweben mit geringer mitotischer Aktivität. Dabei tritt ein Verlust des Radioaktivitätsgehalts auf, im Gegensatz zu Geweben mit reinem Wachstum wie im Tumor und wachsenden Organismus, wo eine Verteilung der Radioaktivität ohne Gesamtaktivitätsverlust stattfindet.

det (STEEL 1965).

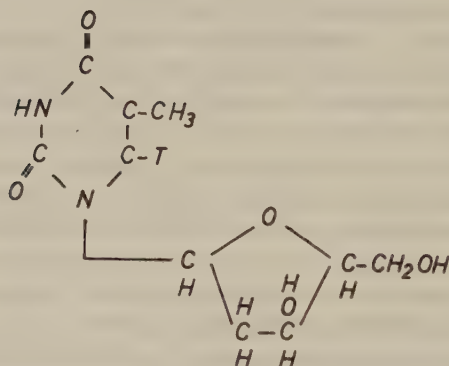
Die Retention markierter DNS in Geweben muß nicht nur abhängig von der Zellumsatzrate sein; drei weitere Faktoren können hinzu kommen. Als erstes ist die Wiederverwertung von markierter DNS bzw. von DNS-Spaltungsprodukten zu nennen, die von abgestorbenen Zellen stammen. Zweitens kann die Bewegung markierter Zellen, wie z.B. Leukozyten, eine Übertragung radioaktiv markierter Moleküle in ein Gewebe bewirken. Als dritter möglicher Faktor ist ein primärer oder sekundärer Strahleneffekt des Tritiums zu berücksichtigen, der durch Schädigung der markierten Zellen eine Retention bzw. Zerfall hervorrufen kann (STEEL 1965). Damit stellt sich das Problem, in welchem Umfang Tritium schädigend auf Zellen bzw. den Zellstoffwechsel einwirkt und dadurch die Aussagekraft spezieller Experimente fragwürdig erscheinen läßt.

Auf Grund einer Halbwertszeit von 12,4 Jahren, einer mittleren β -Energie von 5,7 keV und dem dadurch bedingten hohen Auflösungsvermögen für autoradiographische Untersuchungen wird Tritium bevorzugt zur Markierung zahlreicher metabolisch-aktiver Substanzen verwendet (HUGHES, 1958, VERLEY 1958).

Wegen der extrem kurzen Reichweite der Tritium- β -Strahlung hat eine Inkorporation von z.B. ^3H -markiertem Thymidin jedoch auch eine selektive Strahlenbelastung des Zellkerns zur Folge (KÜNKEL 1962). Von mehreren Autoren wurden strahlenschädigende Wirkungen des Tritiums bei Inkorporierung beschrieben (WIMBER 1959, POST 1961, NATARAJAN 1961, LISCO 1961, SAMUELS 1963, Zajicek 1964, HSU 1964).

Da diese schädigenden Wirkungen in einem Zeitraum von wenigen Tagen bis zu Monaten nach der Anwendung

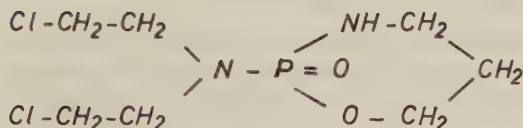
von ^3H -Thymidin manifest werden, stellen sie eine Fehlerquelle nur bei Langzeitversuchen dar. Sie sind wahrscheinlich vernachlässigbar bei Studien, die sich auf die ersten drei oder vier Tage nach Verabreichung von ^3H -Thymidin beschränken und können bei Versuchen, die wenige Stunden nach ^3H -Nucleosid-Applikation abgeschlossen sind, unberücksichtigt gelassen werden (NATARAJAN 1961, BASERGA 1962).



Tritiliertes Thymidin (STOHLMANN 1959)

III. Wirkungsweise und Dosierung von Endoxan

"Endoxan" = Cyclophosphamid (Hersteller: Asta-Werke A.G., Brackwede/Westf.) wurde 1958 in den Handel gebracht und bewährte sich als prä- und post-operative Rezidiv- und Metastasen-Prophylaxe, in der Therapie von einigen wenigen inoperablen Tumoren, Lymphogranulomatosen, Retothelsarkomen und Plasmozytomen. Häufig wird es in Kombination mit Strahlenbehandlung angewendet (GROSS 1964, HAMMER 1964, BLUMENBERG 1964).



Strukturformel von Endoxan^(R)

Endoxan (N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureesterdiamid) gehört zu den alkylierenden Substanzen und ist eine Phosphamidester-Verbindung des Stickstoffloss. Es ist chemisch sehr stabil und zeigt in vitro nur geringe zytostatische Wirksamkeit. Dagegen findet im Säugetierorganismus eine Aktivierung zur zytostatisch wirksamen Form statt. Man nimmt an, daß zwischen einer sogenannten "Trans-

portform" und einer "Wirkform" unterschieden werden muß und die Umwandlung des Cyclophosphamids von der Transportform in die Wirkform im Säugetierorganismus bevorzugt in der Leber stattfindet (BROCK 1960, FOLEY 1961, BROCK 1962, BROCK 1963, BROCK 1964).

Auf Grund neuerer tier-experimenteller Untersuchungen mit ^3H - und ^{14}C -markiertem Endoxan konnte die Annahme, daß erst durch Spaltung der extracyclischen N-P-Bindung ein zytostatisch aktives Umwandlungsprodukt entsteht, nicht aufrecht erhalten werden (HOHORST 1965, GRAUL 1967). Die Stoffwechselbilanzen mit Lost- und Ring-markiertem Endoxan erbrachten keine charakteristischen Unterschiede, so daß keine Abspaltung des Phosphamid-Rings bei der Aktivierung des Endoxans vorliegt (GRAUL 1966).

Die therapeutische Wirkung von Endoxan beruht vermutlich auf einer Mitosehemmung, die als Hemmung der DNS-Synthese anzusehen ist (BROCK 1960, DRUCKREY 1961).

Neuere Untersuchungen lassen es als unwahrscheinlich gelten, daß eine direkte Alkylierung der DNS zur Hemmung der DNS-Synthese führt. Vielmehr ist eine Wirkung über die entsprechenden Enzyme anzunehmen (RUTMAN 1964, KLINKE 1965, RAUEN 1965).

Der Vorteil des Endoxans gegenüber anderen Zytostatika liegt in seiner relativ niedrigen Toxizität. Die auftretende Leukopenie kann leicht unter Kontrolle gehalten werden, und der nach langzeitlicher Behandlung einsetzende Haarausfall und die gelegentlich vorkommende Cystitis sind reversibel. Nach einer Stoßtherapie werden kurzfristig Nebenerscheinungen wie Nausea und Erbrechen beobachtet (SCHUMACHER 1964, GROSS 1964, BOECKL 1964).

Die Dosierung richtet sich nach der Behandlungsart. Für eine Dauerbehandlung werden Dosen von 4-6 mg/kg Körpergewicht angegeben. Als wirksame Einzeldosis in Intervall-Behandlung wird 20-35 mg/kg Körpergewicht empfohlen.

Nach DRUCKREY et al. (1964) gilt die "überlegene Wirksamkeit der massierten Dosis", während eine Behandlung in Form einer "Kur" mit täglichen kleinen Dosen bis zu einer bestimmten Gesamtdosis für unzweckmäßig gehalten wird (DRUCKREY 1963).

B. Experimenteller Teil

I. Methodik und Versuchsanstellung

a) Planung und Durchführung der Versuche

In der vorliegenden Arbeit sollte das Proliferationsverhalten des lymphoretikulären Gewebes zu verschiedenen Zeiten nach Endoxangabe sowie die Wirkung einer zusätzlichen Brucella-Antigen-Injektion untersucht werden. Hierzu wurde mit zwei Versuchsgruppen gearbeitet. In der ersten Versuchsreihe erhielten sämtliche Versuchstiere 33 mg Endoxan pro kg Körpergewicht i.p. injiziert. Diese Dosierung liegt im Bereich der von DRUCKREY empfohlenen wirksamen Einzeldosis bei intermittierender Behandlung (DRUCKREY 1963, DRUCKREY 1964). In der zweiten Versuchsreihe bekamen die Tiere außerdem zwei Tage nach Endoxangabe Brucella-Antigen i.p. injiziert. Jeweils eine Stunde vor Tötung erhielten alle Tiere eine i.p.-Injektion von ^3H -Thymidin (1 $\mu\text{C/g}$ Körpergewicht).

Die Versuche wurden an weiblichen Ratten vom Inzuchtstamm SJV 50 mit einem Gewicht von 150 bis 200 g durchgeführt. In den Versuchsgruppen wurde Endoxan in einer einmaligen Dosis von 33 mg/kg Endoxan, in Aqua dest. gelöst, i.p. injiziert. Die in der entsprechenden Versuchsgruppe applizierte Brucella-Antigen-Gabe erfolgte gleichfalls durch i.p. Injektion von 0,2 ml einer Aufschwemmung abgetöteter Brucella melitensis Keime in einer Konzentration von 6×10^{11} Keimen pro ml Aqua dest. Zur Bestimmung des Thymidineinbaues wurde pro g KG 1 μC ^3H -Thymidin (Thymidine-6-T (n); Radiochemical Centre Amersham, England) mit

einer spezifischen Aktivität von 2 Ci/mM eine Stunde vor Tötung der Tiere i.p. appliziert.

Versuchsgruppen

Die Untersuchungen wurden nach folgender Versuchsplanung durchgeführt:

Kontrollgruppe:

5 Ratten. Tötung der Tiere 1 Stunde nach ^3H -Thymidin-Injektion.

Versuchsgruppe A:

Diese Versuchsgruppe bestand aus 5 Untergruppen zu je 3 Tieren. Alle Tiere erhielten 33 mg/kg Endoxan.

^3H -Thymidin-Injektion:

Gruppe A₁: 2 Tage nach Endoxangabe;

Gruppe A₂: 4 Tage nach Endoxangabe;

Gruppe A₃: 8 Tage nach Endoxangabe;

Gruppe A₄: 12 Tage nach Endoxangabe;

Gruppe A₅: 16 Tage nach Endoxangabe.

Die Tiere sämtlicher Untergruppen wurden 1 Stunde nach ^3H -Thymidin-Injektion getötet.

Versuchsgruppe B:

Diese Versuchsgruppe bestand gleichfalls aus 5 Untergruppen. Alle Tiere erhielten 33 mg/kg Endoxan und zwei Tage später 0,2 ml Brucella-Antigen i.p. injiziert.

^3H -Thymidin-Injektion:

Gruppe B₁: 4 Tage nach Endoxan- = 2 Tage
nach Brucella-Antigen-Gabe;

Gruppe B₂: 6 Tage nach Endoxan- = 4 Tage
nach Brucella-Antigen-Gabe;

Gruppe B₃: 10 Tage nach Endoxan- = 8 Tage
nach Brucella-Antigen-Gabe;

- Gruppe B₄: 14 Tage nach Endoxan- = 12 Tage
nach Brucella-Antigen-Gabe;
Gruppe B₅: 18 Tage nach Endoxan- = 16 Tage
nach Brucella-Antigen-Gabe.

Die Tiere sämtlicher Gruppen wurden eine Stunde nach ³H-Thymidin-Injektion getötet.

Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitation in leichtem Ätherrausch. Nach Ausblutung der Tiere wurden diese durch Injektion von jeweils 20 ml physiol. Kochsalzlösung in die Aorta dreimal durchspült. Zur Untersuchung wurden Thymus, Milz und para-aortale Lymphknoten herauspräpariert und die Organgewichte von Thymus und Milz bestimmt.

Von jedem Tier aus der Kontrollgruppe bzw. aus beiden Versuchsgruppen wurden

- 1.) je zwei Gesamtaktivitätsbestimmungen von Thymus und Milz durchgeführt und
- 2.) je drei autoradiographische Präparate von Lymphknoten und Milz mit Expositionszeiten von 28, 35 und 42 Tagen angefertigt.

Zum Nachweis des Einbaus von ³H-Thymidin in die Zellen wurde mit Hilfe der Flüssigkeits-Scintillationsmessung die Gesamtaktivität der interessierenden Organe bestimmt. Eine Zuordnung der Gesamtaktivität, d.h. des ³H-Thymidins, zu einzelnen Gewebzonen dieser Organe erfolgte durch autoradiographischen Nachweis.

b) Gesamtaktivitätsbestimmungen

Auf Grund der hohen Meßeffektivität für ³H als weichen β -Strahler ist das Liquid-Scintillations-Meßverfahren zum Nachweis der Radioaktivität am geeignetsten. Die zu untersuchende Probe muß mit einer Scintillationslösung, bestehend aus in Toluol gelöstem organischen

Scintillator, gemischt werden und daher in gelöster Form vorliegen. Ein Teil der in der Lösung absorbier-ten Strahlungsenergie wird durch den Scintillator in Licht umgewandelt.

Durch Verwendung von Photomultipliern wird das durch einen radioaktiven Zerfall erzeugte Licht in einen Impuls umgewandelt, der nach Verstärkung in einem entsprechenden Zählgerät registriert werden kann. Die Meßeffektivität für Tritium kann in solchen Geräten bis zu 40 % betragen (ARNOLD 1962). Von den zu unter-suchenden Organen Milz und Thymus mußten zur Bestimmung der ^3H -Aktivität, die ein Maß für das in dem Gewebe eingebaute ^3H -Thymidin darstellt, Organproben in Lö-sung gebracht werden, um mit der Toluol-Scintilla-tions-Lösung mischbar zu sein. Zur Messung der Ge-samt- ^3H -Aktivität eines Organs wurden 10-20 mg einer homogenisierten Probe im Sauerstoff-Medium zu H_2O und CO_2 verbrannt. Diese Verbrennung fand in 1 Lit.-Rundkolben in reiner Sauerstoffatmosphäre statt. Die auf Filterpapier abgewogenen Proben wurden in Platindrahtnetzen, die an den Schliffstopfen der Kol-ben eingeschmolzen sind, mit einer Papierlunte ange-zündet und zur Verbrennung in die luftdicht verschlosse-nen Kolben gebracht. An den Kolben angeschmolzen ist ein Glas-Stutzen, in den eine bestimmte Menge Methanol (10 ml) pipettiert und der während des Ver-brennungsvorgangs in Aceton-Trockeneis-Gemisch auf -60°C gekühlt wurde.

Nach der Verbrennung wurden die Kolben auf ein um die zentrale Kolbenachse rotierendes Gestell gebracht. Das entstandene Tritium-Wasser wurde während der Rota-tion von dem Methanol absorbiert. Ein aliquoter Teil der Methanol-Lösung (5 ml) wurde mit einer entspre-chenenden Menge Toluol-Scintillationslösung (10 ml)

gemischt und in Meßgläschen in den Liquid-Scintillations-Counter zur Aktivitätsmessung gebracht. Nach Abzug eines auf gleiche Weise bestimmten Null-Effektes wurde von der gemessenen Impuls-Rate der eingewogenen Probemenge auf die Impulsrate des Gesamtorgans bzw. auf 1 g des Organs umgerechnet. Durch Bestimmung der Aktivität einer ^3H -Thymidin-Standardlösung wurde die pro Tier injizierte Aktivität bzw. Impulsrate errechnet. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die relativen spezifischen Aktivitäten der betreffenden Organe bestimmt. Die Berechnung erfolgte durch die Korrelation der gesamtapplizierten Aktivität zum Körpergewicht des Tieres und zur spezifischen Aktivität pro g KG. Dieser Basiswert wird gleich 100 % gesetzt und die spezifischen Aktivitäten der untersuchten Organe als relative spezifische Aktivitäten zu diesen Basiswert in die entsprechenden Prozentzahlen umgerechnet.

$$\text{Rel.spez.Akt.} = \frac{\text{spez. Akt.} \times 100 \times \text{KG}}{\text{appl. Akt.}}$$

$$\text{spez.Akt.} = \text{Imp./g Organ} \times \text{Min.}$$

$$\text{appl.Akt.} = \text{Imp./Min.}$$

$$\text{KG} = \text{Körpergewicht in g}$$

Die Scintillationslösung bestand aus: 4 g PPO + 100 mg POPOP ad 1 l Toluol.

PPO = 2,5-Diphenyloxazol

POPOP = (1,4- Bis (2-(5-phenyl-oxazolyl))-benzol)

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einem TRI-CARB 2-Kanal-Spektrometer der Firma Packard. Einstellung: HV = 1040 V; Kanal I 7,0 - 70 V; Kanal II 70 - 100 V.

Zur Korrektur möglicher Löscheffekte wurde die Kanalverhältnismethode angewandt. Durch In-Beziehung-Setzen der Impulsraten in den beiden verschiedenen diskriminierten Kanälen konnte aus der Änderung des Kanal-

verhältnisses (Kanal II/Kanal I) ermittelt werden, ob Löscheffekte in der gemessenen Probe auftraten. In einem solchen Fall konnte aus dem ermittelten Faktor an Hand einer Eichkurve, die mit steigenden Konzentrationen Löscheffekte auslösender Substanzen aufgestellt worden war, das Ausmaß des jeweiligen Löscheffektes bestimmt und die Impulsrate der Probe entsprechend korrigiert werden.

c) Autoradiographie

Durch Autoradiographie histologischer Präparate läßt sich ein genaues Bild über die Verteilung der Aktivität bzw. der radioaktiv-markierten Substanzen in einzelnen Gewebiszonen ermitteln.

Durch Überziehen von histologischen Präparaten mit einer empfindlichen Filmemulsion bewirkt die radioaktive Strahlung bei entsprechend langer Exponierung durch Reaktion in der Photoschicht Schwärzungspunkte bzw. -zonen. Nach Entwicklung und Fixation der Filmschicht läßt sich mikroskopisch durch die Schwärzungspunkte die Radioaktivität einzelnen Zellen und unter Umständen Zellbestandteilen zuordnen.

Lymphknoten und Milz wurden nach Fixation (24 Std. in 10 %igem neutralen Formalin) und Entwässern über eine steigende Alkoholreihe und Methylenbenzoat in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffin-Blöcken wurden 4-6 μ dicke Gewebsschnitte hergestellt, die mit Xylol-Alkohol entparaffiniert wurden. Diese histologischen Präparate wurden mit Stripping-Film (Kodak AR 10) überzogen und im Kühlschrank 28, 35 und 42 Tage exponiert. Die photographische Entwicklung (12 Min. bei 18-20^o) und Fixation (12 Min.) erfolgte unter konstanten Bedingungen in der Dunkelkammer. Die fertigen Autoradiogramme wurden gefärbt (H.E.), getrocknet und in Glycerin-Eukitt eingebettet.

Entsprechend der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung wurde der sogenannte Markierungs-Index bzw. Thymidin-Index durch Auszählung markierter und unmarkierter Zellen und Bestimmung von deren prozentualen Verhältnis zueinander ermittelt.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion. Folgende Gewebszonen wurden ausgezählt; von der Milz: Follikelzentrum, Follikelring und rote Pulpa; vom Lymphknoten: Follikelzentrum, Follikelring und Markzone. Als markiert galten nur diejenigen Zellen, die mindestens 5 Schwärzungspunkte aufwiesen. Das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Zellen wurde jeweils in 10 Gesichtsfeldern einer Gewebszone pro Präparat bestimmt. Von jeder der drei Expositionszeiten wurde ein Präparat ausgezählt. Unterschiede in den Thymidinindices der verschiedenen Expositionszeiten konnten nicht festgestellt werden.

II. Versuchsergebnisse

Durch Auszählung der entsprechenden Autoradiogramme wurden die ^3H -Thymidin-Indices von Lymphknoten-Follikelzentrum, -Follikelring und -Markzone sowie von Milz-Follikelzentrum, -Follikelring und roter Milzpulpa bestimmt. Durch Berechnung der Standard-Abweichungen s_x wurde die Fehlergrenze der Auswertungen ermittelt. Um die unterschiedlichen Auswirkungen zu verdeutlichen, wurde der relative Markierungs-Index für die einzelnen Gewebszonen bestimmt, wobei die Werte der Kontrolltiere gleich 100 % gesetzt wurden.

Versuchsgruppe A:

Die Tabellen 1-3 und Abbildungen 3, 5, 7 zeigen die Ergebnisse der Versuchsgruppe A. Die Tiere dieser Versuchsgruppe wurden zu verschiedenen Zeiten nach einer einmaligen Endoxan-Applikation von 33 mg/kg getötet. Die Werte der Normaltiere sind in den Abbildungen bzw. Tabellen zum Vergleich mit angegeben.

Versuchsgruppe A₁ (2 Tage nach Endoxan-Applikation): Bei Lymphknoten und Milz war in allen Gewebszonen eine starke Verminderung der ³H-Thymidin-Inkorporation gegenüber Normaltieren festzustellen. Die Abbildungen 1a, b, c und 2a, b, c zeigen entsprechende Autoradiogramme. Die ³H-Thymidinabnahme trat am deutlichsten in den Follikelzentren hervor; der ³H-Index betrug bei der Milz 3,8 % und bei den Lymphknoten 4,8 % gegenüber Normaltierwerten von 21,1 % bzw. 22,7 %. Auch im Follikelring war der ³H-Thymidin-Index in der Milz von 2,5 % (Kontrollwert) auf 0,8 %, in den Lymphknoten von 1,7 % auf 0,5 % abgefallen. In der roten Milzpulpa zeigte sich eine Abnahme des Markierungsindex auf 1,6 % im Vergleich zum Normalwert von 3 %. In der Markzone der Lymphknoten war der ³H-Thymidin-Index von 4,6 % (Normalwert) auf 1,3 % gesunken. Die relativen Markierungsindices verdeutlichen die starke Reaktion der Gewebe auf die Endoxangabe.

Die relativen spezifischen Aktivitäten der Organproben (Tab. 3 und Abb. 5) zeigten ebenfalls gegenüber den Normaltierwerten eine Aktivitätsminderung, bei der Milz von 28 % auf 7,9 %, beim Thymus von 25 % auf 4,5 %.

Versuchsgruppe A₂ (4 Tage nach Endoxan-Applikation):

In dieser Versuchsgruppe war bereits eine starke Regeneration in einzelnen Gewebszonen zu verzeichnen (Abb. 1d, 2d). Der ³H-Thymidin-Index der Follikelzentren

überstieg den der Kontrolltiere in den Lymphknoten um 10 % (=absolut bzw. 45 % relativ), in der Milz um 8,6 % (=absolut bzw. 40 % relativ). Die ^3H -Thymidin-Indices der Follikelringe bei Milz und Lymphknoten zeigten gegenüber den Werten der Versuchsgruppe A_1 einen Anstieg, erreichten aber nicht die Höhe der Normaltierwerte. In der Markzone der Lymphknoten lag der ^3H -Thymidin-Index mit 6 % absolut bzw. 130 % relativ über dem Normalwert.

Die relativen spezifischen Aktivitäten von Thymus und Milz waren im Vergleich zu der Versuchsgruppe A_1 erhöht, lagen aber noch unter den Werten der Normaltiere.

Versuchsgruppe A_3 (8 Tage nach Endoxan-Applikation):

Die Ergebnisse zeigten eine Beendigung der Regenerationsphase in den Follikelzentren von Milz und Lymphknoten. Der ^3H -Thymidin-Index entsprach fast dem der Normaltiere. Im Follikelring fand sich im Vergleich zu Versuchsgruppe A_2 ein weiterer Anstieg des Index, der bei der Milz noch nicht die Werte der Normaltiere erreichte, beim Lymphknoten diese überstieg. In der roten Milzpulpa war der ^3H -Thymidin-Index im Vergleich zu den Kontrolltieren nur leicht erhöht. Dagegen zeigte sich in der Markzone der Lymphknoten ein Anstieg auf 8,5 % (relativ = 185 %), wobei jedoch keine statistische Sicherung vorlag.

Die relativen spezifischen Aktivitäten waren gegenüber den Werten der Versuchsgruppe A_2 beim Thymus kaum verändert, bei der Milz stiegen sie an und erreichten fast die Normalwerte.

Versuchsgruppe A_4 und A_5 (12 bzw. 16 Tage nach Endoxan-Applikation): In den Follikelzentren der Lymphknoten waren keine Unterschiede der Indices zu den Normalwerten festzustellen. Im Lymphfollikelring war der ^3H -Index am 12. Tag noch weiter angestiegen, lag aber am 16. Tag

wieder auf dem Niveau der Kontrollen. Der Markierungsindex in der Markzone der Lymphknoten zeigte in der Versuchsgruppe A₄ mit 7,2 % absolut bzw. 157 % relativ noch einen erhöhten Wert, war aber gegenüber der Gruppe A₃ abgefallen. In der Versuchsgruppe A₅ lag der ³H-Thymidin-Index im Bereich der Kontrollwerte. In der Milz war die ³H-Thymidin-Inkorporation 12 und 16 Tage nach Endoxanverabreichung weiterhin erhöht. Am stärksten trat dies in der roten Pulpa hervor mit einem Index von absolut 7,9 % (rel. = 263 %). Im Follikelring stieg der Index auf absolut 3,9 % (rel. = 156 %) an. Die ³H-Thymidin-Einbaurate im Follikelzentrum erreichte Werte von absolut 24,9 % am 12. Tag und absolut 27,6 % (rel. = 130 %) am 16. Tag nach Endoxaninjektion.

Die relativen spezifischen Aktivitäten stiegen sowohl in der Milz als auch im Thymus am 12. bzw. 16. Tag nach Endoxangabe an und lagen über den Kontrollwerten.

Versuchsgruppe B:

Die zweite Versuchstierreihe, bei der zwei Tage nach Endoxanapplikation Brucella-Antigen verabreicht wurde, zeigte in den Ergebnissen Abweichungen von der ersten Versuchsgruppe und von den Normaltierwerten (Tab. 4-6; Abb. 4, 6, 7).

Versuchsgruppe B₁:

2 Tage nach Brucella-Antigen-Gabe = 4 Tage nach Endoxanapplikation war eine Steigerung der ³H-Thymidin-Inkorporation im Follikelzentrum (28,1 % absolut, 123 % relativ) der Lymphknoten und vor allem in der roten Milz-Pulpa (10,7 % abs., 356 % rel.) festzustellen. Im Follikelring und Markzone der Lymphknoten und im Milz-follikel-Zentrum sowie -Ring war hingegen keine statist.

gesicherte Änderung gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen.

Die relativen spezifischen Aktivitäten von Thymus (64 %) und Milz (110 %) bei Gruppe B₁ waren gegenüber den Kontrolltieren stark erhöht.

Versuchsgruppe B₂:

4 Tage nach Antigen- bzw. 6 Tage nach Endoxan-Gabe war in Thymus (39 %) und Milz (91 %) gegenüber der Gruppe B₁ ein Abfall der rel. spez. Aktivitäten vorhanden, der besonders deutlich beim Thymus hervortrat. Die Werte lagen jedoch noch über denen der Kontrollen.

Der ³H-Thymidin-Index bei Versuchsgruppe B₂ fiel im Follikelzentrum der Lymphknoten zu den Normalwerten ab. In der Markzone (8,3 % absolut, 180 % relativ) der Lymphknoten zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung der ³H-Thymidin-Inkorporation, die aber statistisch nicht zu sichern war. Eine Steigerung der ³H-Thymidin-Aufnahme war jedoch im Follikelzentrum der Milz (33,9 % absolut, 160 % rel.) zu erkennen. Der ³H-Thymidin-Index im Follikelring zeigte sich im Vergleich zu Versuchsgruppe B₁ und Normaltieren erniedrigt. In der roten Milzpulpa (7,1 % abs., 237 % rel.) war eine Verminderung des ³H-Thymidin-Einbaus gegenüber der Gruppe B₁ zu verzeichnen, gegenüber den Normaltieren lag aber noch eine beträchtliche Erhöhung vor.

Versuchsgruppe B₃:

10 Tage nach Endoxan = 8 Tage nach Antigen war der ³H-Thymidin-Index im Follikelring der Milz immer noch niedriger als der Normalwert, dagegen im Follikelzentrum (28,9 % abs., 137 % rel.) und roter Pulpa (5,2 % absolut, 173 % relativ) höher, hatte aber im Vergleich

zur Gruppe B₂ abgenommen. Im Lymphknoten lagen bei der Versuchsgruppe B₃ im Follikelzentrum und Follikelring die Werte im Normalbereich. In der Markzone (3 % absolut, 65 % relativ) fand sich ebenfalls eine Einstellung auf die Werte der Kontrollgruppe. Die relativen spezifischen Aktivitäten waren beim Thymus unter die Kontrollwerte abgefallen. In der Milz (80 %) fand gegenüber Versuchsgruppe B₂ eine Verminderung statt; jedoch lagen die Werte noch weit über denen der Normaltiere.

Versuchsgruppe B₄ und B₅:

Im Thymus waren die Werte der relativen spezifischen Aktivitäten 12 Tage nach Antigen-Injektion = 14 Tage nach Endoxan-Gabe gegenüber der Gruppe B₃ weiter abgefallen, 16 Tage nach Antigen = 18 Tage nach Endoxan wieder angestiegen. Sie erreichten aber nicht die Normaltierwerte. In der Milz war die relative spezifische Aktivität bei Gruppe B₄ im Vergleich zu Gruppe B₃ gesunken (54 %), lag aber noch über dem Normalwert. Bei Versuchsgruppe B₅ stieg der Wert auf 68 % an.

Die ³H-Thymidin-Indices bei der Versuchsgruppe B₄ und B₅ zeigten in allen Gewebszonen der Lymphknoten Werte im Bereich der Kontrolltiere. Im Follikelzentrum der Milz war bei Versuchsgruppe B₄ und B₅ die ³H-Thymidin-Inkorporation im Vergleich zu Versuchsgruppe B₃ auf Normalwerte abgefallen. Zeigte sich bei Versuchsgruppe B₄ im Follikelring noch eine verminderte ³H-Thymidinaufnahme, so war bei der Gruppe B₅ ein Anstieg auf Normalwerte zu erkennen. In der roten Milzpulpa hatte sich der ³H-Thymidin-Index bei der Versuchsgruppe B₄ im Vergleich zu den Normaltieren verdoppelt (6,1 % absolut, 203 % relativ), bei Gruppe B₅ verdreifacht (9,1 % absolut, 303 % relativ).

Tab. 1

L y m p h k n o t e n

Versuchsgruppen	Follikelzentrum				Follikelring				Markzone			
	markZellen %		rel.Markie- rungsindex %		mark.Zellen %		rel.Markie- rungsindex %		mark.Zellen %		rel.Markie- rungsindex %	
	x	s _x	x	s _x	x	s _x	x	s _x	x	s _x	x	s _x
Normaltiere	22,7	±2,44	100	±10	1,7	±0,37	100	±21	4,6	±1,16	100	±25
Gruppe A ₁	4,8	±0,81	21	±3	0,5	±0,2	29	±11	1,3	±0,28	28	±6
Gruppe A ₂	32,9	±2,94	145	±12	1,2	±0,19	70	±11	6,0	±1,02	130	±22
Gruppe A ₃	23,0	±1,35	100	±5	2,1	±0,37	124	±21	8,5	±3,21	185	±69
Gruppe A ₄	22,5	±3,29	100	±14	2,4	±0,47	141	±27	7,2	±2,11	157	±45
Gruppe A ₅	22,4	±0,6	100	±2	1,8	±0,61	100	±35	3,8	±0,7	83	±15

Tab. 2

M i l z

Versuchsgruppen	Follikelzentrum				Follikelring				rote Pulpa			
	mark. Zellen %	x	s _x	rel. Markie- rungsindex %	mark. Zellen %	x	s _x	rel. Markie- rungsindex %	mark. Zellen %	x	s _x	rel. Markie- rungsindex %
Normaltiere	21,1 ±2,61			100 ±12	2,5 ±0,31			100 ±12	3,0 ±1,42			100 ±47
Gruppe A ₁	3,8 ±1,14			18 ± 5	0,8 ±0,47			32 ±18	1,6 ±0,76			53 ±25
Gruppe A ₂	29,7 ±2,54			141 ±12	1,1 ±0,28			44 ±11	3,8 ±0,91			127 ±30
Gruppe A ₃	22,9 ±1,77			108 ± 8	1,8 ±0,53			72 ±21	3,6 ±0,48			120 ±16
Gruppe A ₄	24,9 ±2,27			118 ±10	3,9 ±0,59			156 ±23	7,9 ±1,9			263 ±63
Gruppe A ₅	27,6 ±2,28			130 ±10	3,9 ±0,47			156 ±18	7,8 ±1,91			260 ±63

Tab. 3

Versuchsgruppen	M i l z rel.spez.Akt. %	T h y m u s rel.spez.Akt. %
Normaltiere	28	25
Gruppe A ₁	7,9	4,5
Gruppe A ₂	19	20
Gruppe A ₃	26	19
Gruppe A ₄	63	29
Gruppe A ₅	85	55

Rel. spez. Aktivitäten von Milz und Thymus der Ratte an verschiedenen Tagen nach Endoxan-Injektion (33 mg/kg), 1 Stunde vor Tötung Applikation von ³H-Thymidin.

Tab. 4

L y m p h k n o t e n

Versuchsgruppen	Follikelzentrum				Follikelring				Markzone			
	mark.Zellen		rel.Markierungsindex		mark.Zellen		rel.Markierungsindex		mark.Zellen		rel.Markierungsindex	
	x	s _x	%	x	s _x	%	x	s _x	x	s _x	x	s _x
Normaltiere	22,7	±2,44		100	±10		100	±21	4,6	±1,16	100	±25
Gruppe B ₁	28,1	±1,5		123	±6		71	±32	5,7	±1,93	124	±42
Gruppe B ₂	21,5	±1,1		95	±4		65	±21	8,3	±3,15	180	±68
Gruppe B ₃	22,9	±3,62		100	±16		88	±22	3,0	±1,5	65	±32
Gruppe B ₄	23,5	±1,85		103	±8		88	±37	3,1	±0,66	66	±14
Gruppe B ₅	24,3	±5,9		107	±26		100	±45	4,2	±1,97	91	±42

Tab. 5

M i l z

Versuchsgruppen	Follikelzentrum			Follikelring			Rote Pulpa		
	mark. Zellen %	x	s _x	rel. Markie- rungsindex %	mark. Zellen %	x	s _x	mark. Zellen %	rel. Markie- rungsindex %
Normaltiere	21,1 ± 2,61	100	±12	2,5 ± 0,31	100	±12	3,0 ± 1,42	100	± 47
Gruppe B ₁	20,4 ± 1,05	97	± 4	2,8 ± 0,1	112	± 4	10,7 ± 1,8	356	± 60
Gruppe B ₂	33,9 ± 2,88	160	±13	1,4 ± 0,39	56	±15	7,1 ± 1,62	237	±54
Gruppe B ₃	28,9 ± 3,82	137	±18	1,3 ± 0,37	52	±14	5,2 ± 1,23	173	±41
Gruppe B ₄	22,3 ± 3,25	106	±15	1,3 ± 0,1	52	± 4	6,1 ± 2,4	203	±80
Gruppe B ₅	22,7 ± 4,97	118	±23	2,4 ± 1,19	100	±47	9,1 ± 3,41	303	±114

Tab. 6

Versuchsgruppen	M i l z rel.spez.Akt. %	T h y m u s rel.spez.Akt. %
Normaltiere	28	25
Gruppe B ₁	110	64
Gruppe B ₂	91	39
Gruppe B ₃	80	20
Gruppe B ₄	54	18
Gruppe B ₅	68	23

Rel. spez. Aktivitäten von Milz und Thymus der Ratte nach Endoxan- und zusätzlicher Brucella-Antigen Gabe. Eine Stunde vor Tötung ³H-Thymidin-Injektion.

Abb.1a - f: Autoradiogramme von der Milz der Ratte
60 Min. nach Injektion von ^3H -Thymidin
(H.E.-Färbung, Strippingfilm Kodak
AR 10).

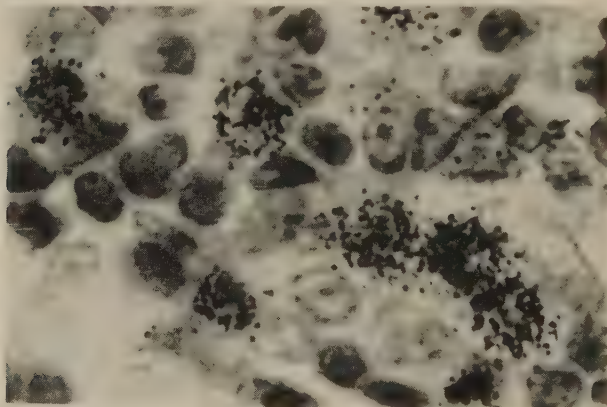


Abb.1a: Unbehandeltes Kontrolltier

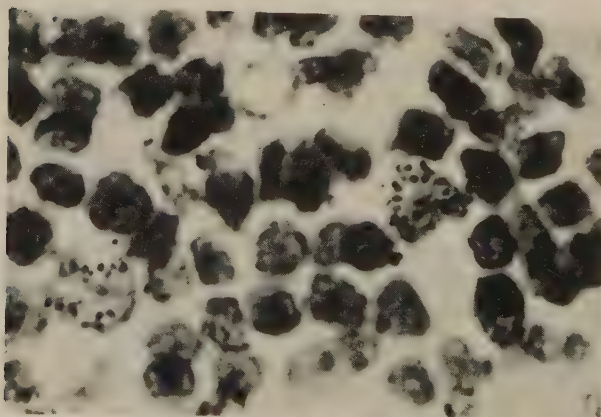


Abb.1b: 2 Tage nach einmaliger Verab-
reichung von 33 mg/kg Endoxan

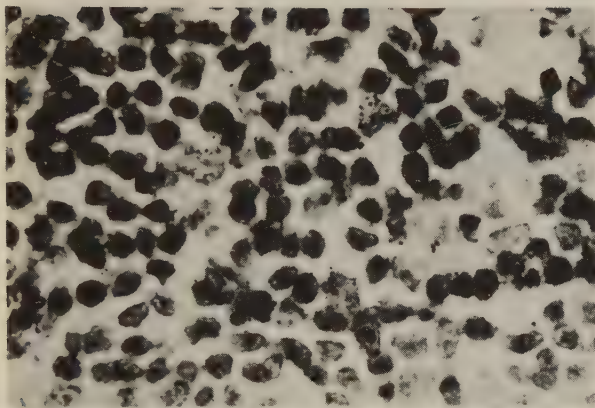


Abb. 1c: 2 Tage nach Endoxan-Gabe

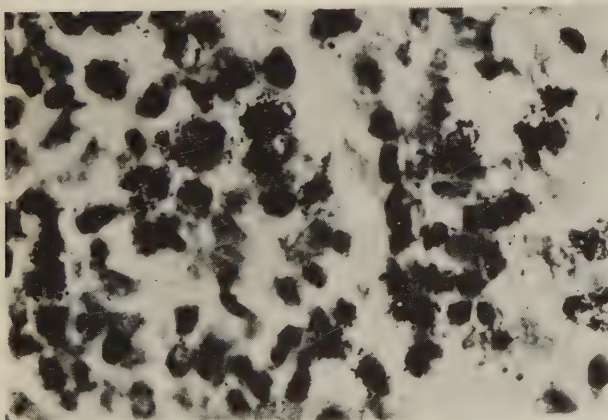


Abb. 1d: 4 Tage nach Endoxan-Applikation

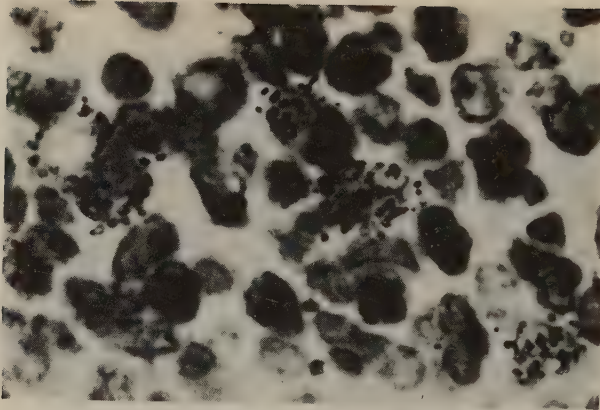


Abb. 1e: 2 Tage nach Brucella-Antigen-Gabe =
4 Tage nach Endoxan-Applikation

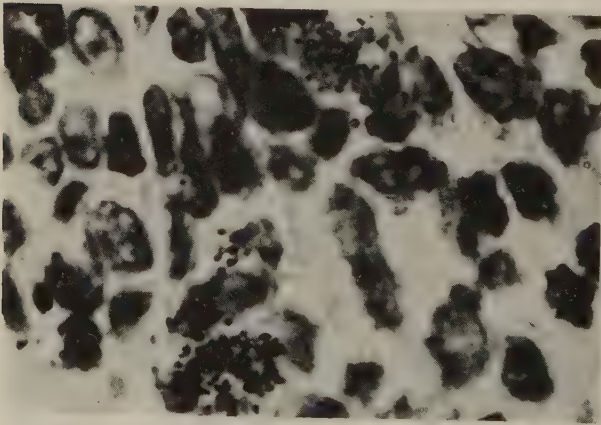


Abb. 1f: 4 Tage nach Brucella-Antigen-
bzw. 6 Tage nach Endoxan-Gabe

Abb. 2a-f : Autoradiogramme von Lymphknoten der Ratte 1 Std. nach Injektion von ^3H -Thymidin (H.E.Färbung, Strippingfilm Kodak AR 10)

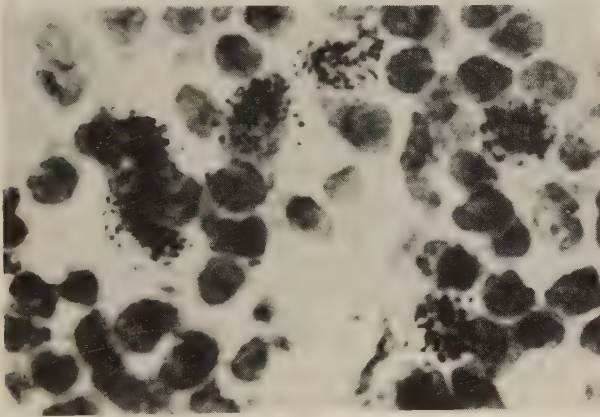


Abb. 2a: Kontrolltier

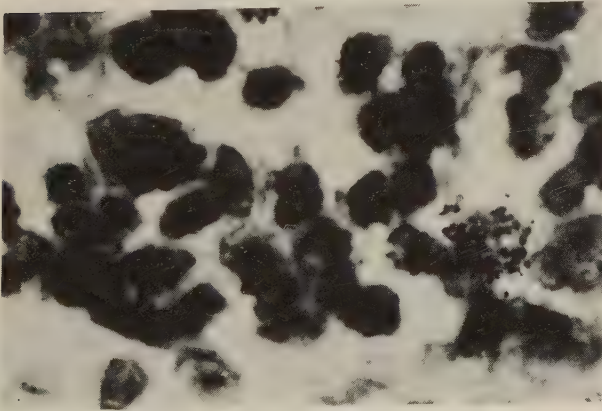


Abb. 2b: 2 Tage nach einmaliger Endoxan-
Verabreichung von 33 mg/kg

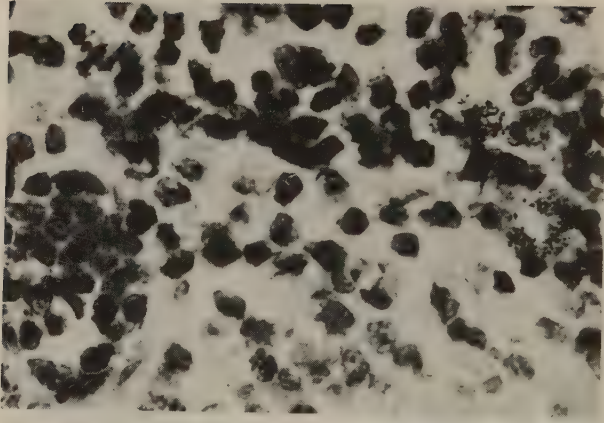


Abb. 2c: 2 Tage nach Endoxan-Applikation

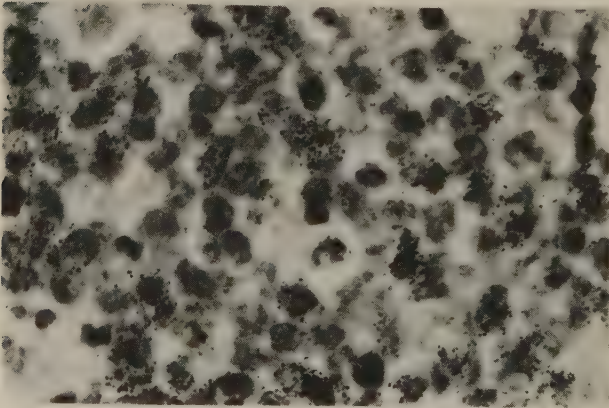


Abb. 2d: 4 Tage nach Endoxan-Gabe

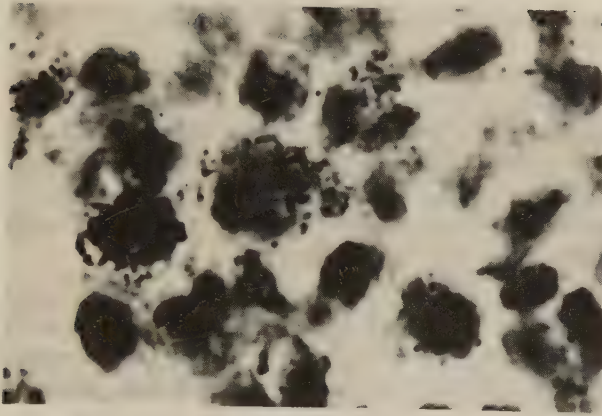


Abb. 2e: 2 Tage nach Brucella-Antigen-Injektion
bzw. 4 Tage nach Endoxan-Gabe

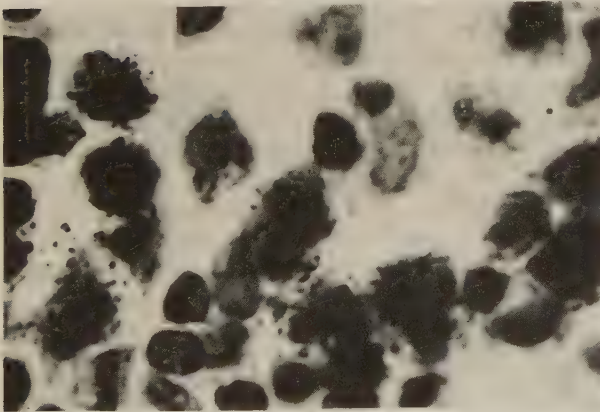


Abb. 2f: 4 Tage nach Brucella-Antigen- = 6 Tage
nach Endoxan-Gabe

C. Besprechung der Ergebnisse

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die ^3H -Thymidin-Indices von Lymphknoten und Milz sowie die relativen spezifischen Aktivitäten von Milz und Thymus mit Hilfe spezieller Verfahren bestimmt. Die Ergebnisse vermitteln ein Bild vom Proliferationsausmaß dieser Organe und einzelner Gewebiszonen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

In der Versuchsgruppe A wurde die Wirkung einer einmaligen Endoxan-Dosis von 33 mg/kg untersucht. Die Versuchsergebnisse wurden mit denen der Versuchsgruppe B verglichen, in der die Versuchstiere 2 Tage nach Endoxan-Gabe Brucella-Antigen injiziert bekamen. Es sollte festgestellt werden, ob nach Endoxan-Gabe ein Antigen-Reiz eine signifikante Wirkung auf die Proliferation bei Lymphknoten, Milz und Thymus ausübt.

Im Lymphknoten war 2 Tage nach Endoxan-Gabe in allen drei Gewebiszonen (Follikel-Zentrum, -Ring und Markzone) eine deutliche Verminderung der ^3H -Thymidin-Einlagerung festzustellen. 4 Tage nach Endoxan-Injektion zeigten Versuchsgruppe A (Endoxan allein) und Versuchsgruppe B (Endoxan + Antigen) in den Lymphfollikelzentren einen Anstieg des ^3H -Thymidin-Index, der bei Gruppe B abgeschwächer auftrat. 8 Tage nach Endoxan-Applikation lag bei Gruppe A der ^3H -Thymidin-Einbau im Follikelzentrum wieder im Normalbereich, bei Gruppe B sank er 6 Tage nach Endoxan-Gabe ebenfalls auf Normalwerte.

Im Follikelring der Lymphknoten war am 4. Tag nach Endoxan-Gabe eine Verminderung des ^3H -Thymidin-Einbaus sowohl bei Gruppe A als auch bei Gruppe B festzustellen. Bei Versuchsgruppe A folgte 4 Tage später eine erhöhte Proliferation, die am 12. Tage nach Endoxan-Gabe immer

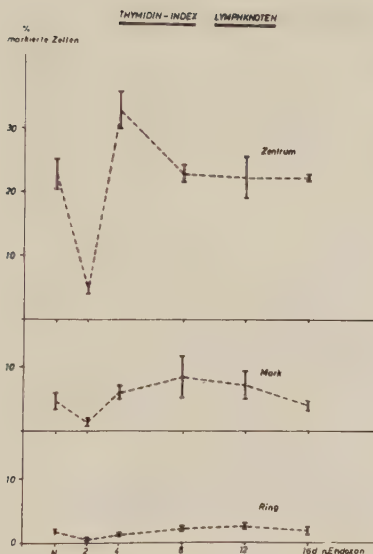


Abb. 3: ^3H -Thymidin-Indices der Lymphknoten zu verschiedenen Tagen nach Endoxan-Injektion

noch vorhanden war und erst am 16. Tag wieder in den Bereich der Kontrollwerte zurückging. Dagegen zeigte die Versuchsgruppe B auch 6, 10 und 14 Tage nach Endoxan-Gabe noch eine geringe Verminderung der Indices gegenüber Kontrollwerten. Am 18. Tag lag der Wert im Normalbereich.

In der Markzone der Lymphknoten zeigte sich bei der Versuchsgruppe A vom 4. Tag an ein Anstieg des ^3H -Thymidin-Index bis zum 12. Tag nach Applikation mit

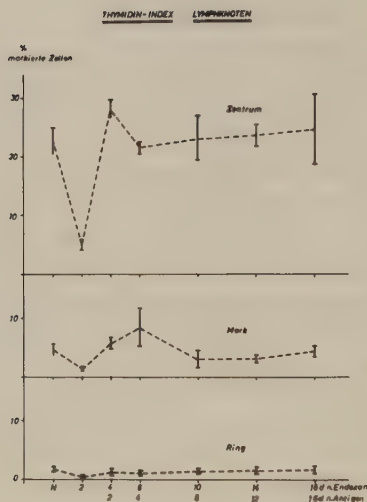


Abb. 4: ^3H -Thymidin-Indices der Lymphknoten nach Endoxan- und Antigen-Gabe

einem deutlichen Maximum am 8. Tag. Am 16. Tag war der Index-Wert im Normalbereich. Bei der Versuchsgruppe mit zusätzlicher Antigen-Gabe trat dagegen nur am 6. Tag nach Endoxan-Applikation (= 4 Tage nach Antigen-Gabe) eine Erhöhung des ^3H -Thymidin-Index auf, während ab 10. Tag bis zum 18. Tag die Werte im Normenbereich lagen.

Sowohl bei Versuchsgruppe A als auch bei Gruppe B lag 16 bzw. 18 Tage nach Endoxan-Gabe in den drei untersuchten Gewebsezonen der Lymphknoten ein normales Proliferationsbild vor (Abb. 3, 4).

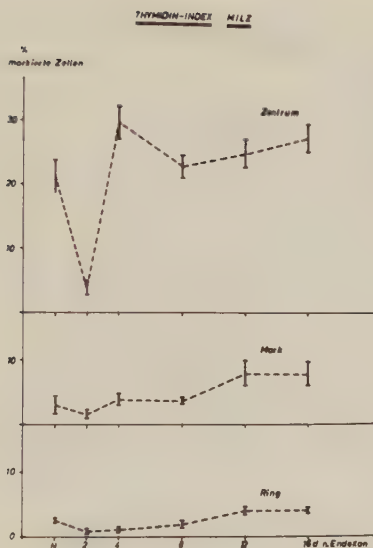


Abb. 5: ^3H -Thymidin-Indices der Milz zu verschiedenen Tagen nach Endoxan-Applikation

Zwei Tage nach Endoxan-Gabe zeigte sich in allen drei Gewebszonen der Milz ebenfalls eine starke Depression der ^3H -Thymidin-Inkorporation. Am 4. Tag nach Endoxan-Injektion trat im Follikelzentrum eine Steigerung der ^3H -Thymidin-Aufnahme ein, die nach Rückgang auf Normalwerte am 8. Tag eine erneute Steigerung am 12. und 16. Tag erfuhr. Auch im Follikelring und besonders in der roten Pulpa lag am 12. und 16. Tag nach Endoxan-Gabe eine erhöhte ^3H -Thymidin-Einbaurrate vor.

Durch Antigen-Gabe wurde am 4. Tag nach Endoxan-Injektion (= 2. Tag nach Antigen-Gabe) in Follikel-Zen-

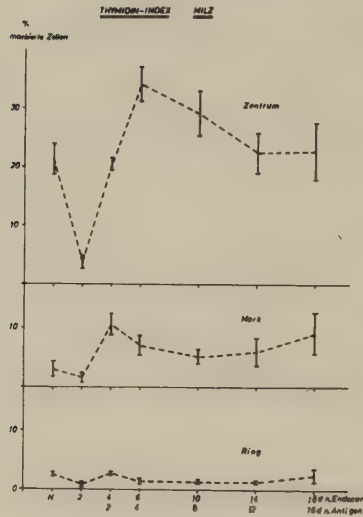


Abb. 6: ^3H -Thymidin-Indices der Milz nach Endoxan- und Antigen-Gabe

trum und -Ring keine Änderung gegenüber Normalwerten beobachtet, jedoch trat am 6. und 10. Tag nach Endoxan-Gabe im Follikelzentrum eine Zunahme der ^3H -Thymidin-Inkorporation auf, die nach Abfall in den Normalbereich am 14. Tag wieder einen geringen Anstieg am 16. Tag erfuhr. In der roten Milzpulpa traten die Reaktionen durch Antigen-Reiz noch deutlicher hervor. Vier Tage nach Endoxan-Gabe war eine stark erhöhte Proliferation vorhanden, die das 3-fache der Normalwerte überschritt. Nach einer Abnahme der ^3H -Thymidin-Werte bis zum 10. Tag, wo jedoch gegenüber den Kontrollen immer noch eine beträchtliche Erhöhung vorlag, stiegen

die Werte bis zum 18. Tag wieder auf das 3-fache der Normalwerte an.

In der Milz zeigte sich somit ein Unterschied zwischen Endoxangabe allein und zusätzlicher Antigen-Gabe. Nach Antigen-Gabe war im Follikelzentrum die Proliferation am 4. Tag, im Gegensatz zu den nur mit Endoxan behandelten Tieren, auf Normalwerte erniedrigt, während dann am 6. Tag eine überschießende Reaktion stattfand. Besonders starke Ausmaße nahm die Erhöhung der Proliferationsrate in der roten Pulpa an. Sie wies durch Antigen-Gabe eine enorme Steigerung auf, die jedoch am 14. und 16. Tag statistisch nicht gesichert werden kann. Die Schwankung der Proliferationsrate - zunächst Steigerung, dann Minderung und wieder Steigerung - ist wahrscheinlich Ursache einer sich addierenden Wirkung von Endoxan und Antigen (Abb. 5, 6).

Die relativen spezifischen Aktivitäten der Milz lagen 4 und 8 Tage nach Endoxan-Gabe niedriger als die der Kontrollen. Bei der Gruppe B hingegen überstiegen sie das 3-fache der Normalwerte und zeigten am 6. und 10. Tag noch immer sehr hohe Werte. 12 Tage nach Endoxan-Injektion war bei Gruppe A die relative spezifische Aktivität auf das Doppelte des Normalwertes gelangt und am 16. Tag ein weiterer Anstieg der Werte eingetreten. Bei Versuchsgruppe B fielen die Aktivitätswerte ab, übertrafen jedoch noch die Kontrollwerte. Am 18. Tag war wieder ein Anstieg vorhanden (Abb. 7).

Im Thymus lagen die Aktivitätswerte 4 und 8 Tage nach Endoxan-Gabe bei Gruppe A unter den Werten der Normaltiere. Bei Versuchsgruppe B waren am 4. Tag nach Endoxan-Injektion die relativen spezifischen Aktivitäten erhöht, am 6. Tag fielen sie etwas ab. Am 12. Tag trat bei Versuchsgruppe A eine Aktivitäts~~erhöhung~~erhöhung ein, die am 16. Tag das Doppelte der Normalwerte betrug. Bei Gruppe

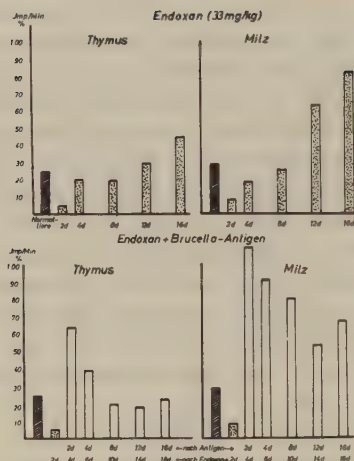


Abb. 7: Rel.spez.Aktivität in Thymus und Milz an verschiedenen Tagen nach Endoxan-Applikation bzw. mit zusätzlicher Brucella-Antigen-Gabe

B sanken die rel. spez. Aktivitäten 10 und 14 Tage nach Endoxan-Gabe unter Normalwerte ab und hatten am 18. Tag nur eine geringe Zunahme zu verzeichnen (Abb. 7).

Die rel. spez. Aktivitäten des Thymus wiesen viel niedrigere Werte auf als die der Milz. Durch Antigen-Reiz war im Thymus 4 Tage nach Endoxan-Gabe eine Erhöhung der Aktivitäten eingetreten. Bis zum 18. Tag nach Endoxan-Gabe nahmen die rel. spez. Aktivitäten bis unter Normalwerte ab. In der Milz lagen am 18.Tag immer noch erhöhte Werte vor.

Vergleicht man die ^3H -Thymidin-Indices der roten Milzpulpa und die rel. spez. Aktivitäten der Milz miteinander, so finden sich fast gleiche Bilder. Dies ist damit zu erklären, daß die rote Pulpa den größten Teil des Organs ausmacht.

In den Lymphknoten fand sich zwischen Versuchsgruppe A und Gruppe B kein deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten, wie er bei der Milz festzustellen war. Da bei korpuskulären Antigenen die Milz als Filter-Organ wirkt, mag hierin die mögliche Ursache zu suchen sein.

Die den vorliegenden Ergebnissen als Vergleich zugrunde liegenden Normalwerte stimmen mit den von EDWARDS und KLEIN (1961) gefundenen Werten weitgehend überein (BASERGA 1962). Die in allen drei Organen feststellbare ^3H -Thymidin-Einbauhemmung 2 Tage nach Endoxan-Gabe findet eine Bestätigung in den Versuchsergebnissen verschiedener Autoren (STENDER 1961, PALME 1963, PALME 1963, LISS 1964, POTEL 1965).

Die 4 Tage nach Endoxan-Injektion eingetretene erhöhte ^3H -Thymidin-Inkorporation läßt eine wesentliche Schädigung der drei untersuchten Organe ausschließen. 16 Tage nach Endoxan-Gabe lag in allen Gewebzonen der Lymphknoten ein den Normaltieren entsprechendes Proliferationsbild vor. Von BROCK und POTEL (1965) wurde eine gleiche zeitliche Begrenzung der Endoxanwirkung festgestellt, wie auch wir sie bei Lymphknoten gefunden haben. Dagegen war in der Milz sowohl durch Bestimmung der ^3H -Thymidin-Indices als auch der rel. spez. Aktivitäten 16 Tage nach Endoxan-Gabe noch eine gesteigerte Proliferation zu bemerken. Der Grund dafür ist darin zu suchen, daß die Milz eine hämatopoetische Aufgabe erfüllt und bei der Normalisierung des Blutbildes mitwirkt.

Durch eine Antigen-Gabe zeigte sich in den Lymphknoten eine geringe Beeinträchtigung der Reaktionen gegenüber den nur mit Endoxan behandelten Tieren. Von STENDER (1964) wird angegeben, daß Endoxan (40 mg/kg), 2 Tage nach Antigen-Gabe verabfolgt, im Lymphknoten eine Abnahme der DNS-Synthese unter Normalwerte verursachte und erst am 10. Tag nach Endoxan-Gabe ein Wiederanstieg zu verzeichnen war. Durch Antigen-Gabe allein wurde am 2. Tag p.i. eine deutliche Stimulierung der DNS-Synthese beobachtet, die bis zum 7. Tag anhielt. Zu ähnlichen Resultaten führten die vorliegenden Untersuchungen bei Lymphknoten. Daher muß die nach Antigen-Verabreichung aufgetretene Proliferationsbeeinträchtigung auf ein Zusammenwirken von Endoxan und Antigen beruhen.

Weiterhin berichten STENDER und Mitarbeiter (1963), daß sie nach Endoxan-Applikation vor oder nach Antigen-Gabe eine verhältnismäßig schnelle und gleichstarke Erholung des antikörperbildenden Gewebes beobachten konnten. Bei vorausgegangener zytostatischer Behandlung gab die Reaktion auf das später verabreichte Antigen sowohl das Ausmaß der Schädigung als auch der Erholung des lymphoretikulären Gewebes wieder. Ebenfalls konnte bei vorliegenden Untersuchungen durch Endoxan-Gabe bzw. anschließende Antigen-Gabe keine Schädigung in der Proliferationsfähigkeit der Gewebe gefunden werden.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Versuchsergebnissen geschlossen werden, daß eine Beeinträchtigung der Proliferation durch Antigen-Verabreichung nach Endoxan-Gabe nur in der Milz, und zwar der roten Pulpa, deutlich wird. In den Lymphknoten konnte ein statistisch gesicherter Unterschied in den beiden Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden.

D. Zusammenfassung

An verschiedenen Tagen nach einmaliger Endoxan-Applikation (33 mg/kg Körpergewicht) wurde das Proliferationsverhalten in Milz, Lymphknoten und Thymus der Ratten untersucht. In einer zweiten Versuchsreihe interessierte die Beeinflussung der Proliferation durch Brucella-Antigen-Gabe, die 2 Tage nach Endoxan-Applikation erfolgte. Eine Stunde vor Tötung bekamen alle Tiere ^3H -Thymidin (1 $\mu\text{C/g}$ Körpergewicht) i.p. injiziert. Es wurden Autoradiogramme hergestellt und der ^3H -Thymidin-Index von verschiedenen Gewebiszonen der Milz und Lymphknoten ermittelt. Durch das Scintillationsmeßverfahren wurden die rel.spez. Aktivitäten von Thymus und Milz bestimmt.

2 Tage nach Endoxan-Gabe zeigte sich in den drei untersuchten Organen sowohl autoradiographisch als auch durch Aktivitätsbestimmung eine massive Depression der ^3H -Thymidin-Inkorporation. Ab 4. Tag nach Endoxan-Gabe setzte in den Organen eine starke Regeneration ein. In den Lymphknoten entsprach am 16. Tag nach Endoxan-Injektion das Proliferationsbild wieder dem der Kontrollen, während bei der Milz noch eine Erhöhung des ^3H -Thymidin-Einbaus gegenüber Kontrollen vorhanden war. Durch Antigen-Gabe wurde in den Lymphknoten kein statistisch gesicherter Unterschied der Proliferation festgestellt. 18 Tage nach Endoxan- = 16 Tage nach Antigen-Gabe lag die ^3H -Thymidin-Inkorporation im Normbereich. Die rel. spez. Aktivitäten im Thymus ließen im Vergleich zur Milz ein schwächeres und verzögertes Reaktionsvermögen erkennen. In der Milz zeigte sich durch Antigen-Reiz ein deutlicher Effekt auf das Proliferationsgeschehen, der besonders in der roten Milzpulpa zu erheb-

licher Zunahme der ^3H -Thymidin-Aufnahme führte. Ein weitgehend übereinstimmendes Bild lieferten die Werte der rel. spez. Aktivitäten der Milz und die ^3H -Thymidin-Indices der roten Milzpulpa.

E. Literatur

- ARNOLD, J.R.: Liquid Scintillation Counting of Tritium
in: S.Rothchild : Advances in Tracer Methodology Vol.1,
Plenum Press New York 1962
- BASERGA, R., W.E.KISIELESKI: Recent Observations on Cell Proliferation and Metabolism by Radioautography with Tritiated Compounds. Atompraxis 8, 386 (1962)
- BLUMENBERG, F.-W.: Möglichkeiten der Malignombehandlung durch Kombination von Röntgenstrahlen mit medikamentöser Therapie. Med.Welt 1267 (1964)
- BOECKL, O., N.HEITZ, K.KARRER, E.MANNHEIMER:
Über die Möglichkeit der Therapie bösartiger Tumoren mit hochdosierten Zytostatika.
Arzneim.-Forsch. 14, 797 (1964)
- BOLLUM, F.J.: DNA Synthesis by Enzymes from Mammalian Tissues: Calf Thymus Polymerase. Fed.Proc. 18, 194 (1959)
- BROCK, N., H.J.HOHRST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus. Naturwissenschaften 24, 610 (1962)
- BROCK, N., H.J.HOHRST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzneim.-Forsch. 13, 1021 (1963)
- BROCK, H., H.J.HOHRST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus. In: H.Wilmanns: Chemotherapie maligner Tumoren, Schattauer Stuttgart 1964
- BROCK, N., H.WILMANN: Pharmakologische Grundlagen der Chemotherapie des Krebses. Therapie-woche 10, 12 (1960)

- CLEAVER, J.E., R.M.HOLFORD: Investigations into the Incorporation of ^3H -Thymidine into DNA in L-Strain Cells and the Formation of a Pool of Phosphorylated Derivatives during Pulse Labelling. *Biochim.Biophys.Acta* 103, 654 (1965)
- DAVIDSON, J.N.: Problems in Polynucleotide Biosynthesis. In: T.W.Goodwin, O.Lindberg: Biological Structure and Function I, Ac.Press London-New York 1961
- DRUCKREY, H.: Chemotherapie des Krebses. *Med.Klin.* 56, 1421 (1961)
- DRUCKREY, H., D.STEINHOFF, M.NAKAYAMA, R.PREUSSMANN, K.ANGER: Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan. *Dtsch.med.Wschr.* 88, 651, 715 (1963)
- DRUCKREY, H., D.STEINHOFF, M.NAKAYAMA, R.PREUSSMANN, K.ANGER: Dosisproblem in der Krebs-Chemotherapie und Wirkungsweise des Endoxans. In: H.Wilmanns: Chemotherapie maligner Tumoren, Schattauer Stuttgart 1964
- EDWARDS, J.L., R.E.KLEIN: Cell Renewal in Adult Mouse Tissues. *Am.J.Path.* 38, 437 (1961)
- EKER, Per: Activities of Thymidine Kinase and Thymine Deoxyribonucleotide Phosphatase during Growth of Cells in Tissue Culture. *J.Biol.Chem.* 240, 2607 (1965)
- FOLEY, G.E., O.M.FRIEDMAN, B.P.DROLET: Studies on the Mechanism of Action of Cytosan;

Evidence of Activation in Vivo
and in Vitro.

Cancer Res. 21, 57 (1961)

- GRAUL, E.H., H.HUNDESHAGEN, E.SCHAUMLÖFFEL, G.SIMON,
H.WILMANN: Animal Tests and Clinical Studies on the Metabolism of Radioactive Cyclophosphamide (Endoxan^(R)). Internat. Krebskongreß Tokio 1966
- GRAUL, E.H., H.HUNDESHAGEN, E.SCHAUMLÖFFEL, G.SIMON,
H.WILMANN: Animal Tests and Clinical Studies on the Metabolism of Radioactive Cyclophosphamide (Endoxan^(R)). Cancer i.Druck (1967)
- GROSS, R.: Stand der Behandlung maligner Tumoren mit Zytostatika. Therapiewoche 14, 368 (1964)
- GRUNDMANN, E.: Allgemeine Cytologie, Georg Thieme Stuttgart 1964
- HAMMER, B.: Zur radiologisch-zytostatischen Kombinationsbehandlung maligner Tumoren. Wien.med.Wschr. 114, 476 (1964)
- HOHORST, H.J., A.ZIEMANN, N.BROCK: Alkylierende Substanzen in Serum und Urin nach Injektion von Cyclophosphamid. Arzneim.-Forsch. 15, 432 (1965)
- HOLLEMAN-RICHTER: Lehrbuch der org. Chemie S.563, Walter de Gruyter Berlin 1960
- HSU, T.C., Maria T.ZENZES: Chromosome Aberrations Induced by Incorporation of Triated Thymidine. Symp.Fundamental Cancer Res. 18, 404 (1964)

- HUGHES, W.L., V.P.BOND, E.P.CRONKITE, Mitarb.:
Cellular Proliferation in the
Mouse as Revealed by Autoradiography
with Tritiated Thymidine. Proc.nat.
Acad.Sci.(Wash.)44, 476, 956 (1958)
- JACOBSON, B., D.M.PRESCOTT: The Nucleotide Pools
for Thymidine and Cytidine in Te-
trahymena pyriformis. Exp.Cell
Res. 36, 561 (1964)
- KARLSON, P.: Biochemie, Georg Thieme Stuttgart
1964
- KLINKE, F., E.LISS, G.PALME: ^3H -Endoxan: Verteilungs-
kinetik und DNS-Bindung. In: Radio-
nuklide in der klin. u. exper.
Onkologie, Schattauer Stuttgart 1965
- KOBURG, E., W.MAURER: Autoradiographische Untersu-
chung mit ^3H -Thymidin über die Dauer
der DNS-Synthese und ihren zeitlichen
Verlauf bei den Darmepithelien und
anderen Zelltypen der Maus. Biochim-
Biophys.Acta 61, 229 (1962)
- KORNBERG, A.: Die biologische Synthese von DNS.
Angew.Chemie 72, 231 (1960)
- KÜNKEL, H.A.: Zur Frage der Strahlenbelastung des
Zellkerns durch Inkorporation von
tritiummarkiertem Thymidin. Strahlen-
therapie 118, 46 (1962)
- LISCO, H., R.BASERGA, W.E.KISIELESKI: Induction of
Tumours in Mice with Tritiated
Thymidine. Nature 192, 571 (1961)
- LISS, E.: Biochemische Untersuchungen über den
Einfluß des Endoxans auf die Nuklein-
säuresynthese. In: H.Wilmanns:
Chemotherapie maligner Tumoren,
Schattauer Stuttgart 1964

- NATARAJAN, A.T.: Chromosome Breakage and Mitotic Inhib. Induced by Tritiated Thymidine in Root Meristems of *Vicia faba*. *Exp.Cell Res.* 22, 275 (1961)
- OEHLERT, W.: Zellmauserung und Zellgeneration. Umschau in Wissenschaft u.Technik, Frankfurt/M., Heft 17, 518 (1964)
- PALME, G., E.LISS: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Cyclophosphamid (Endoxan) auf die DNS-Synthese proliferierender Zellsysteme der Maus. *Klin.Wochenschr.* 6, 291 (1963)
- PALME, G., E.LISS, K.OEFF, A.PLATIS: Der Einfluß von Cyclophosphamid auf die Desoxyribonucleinsäure-Synthese von normalen proliferierenden Zellen sowie Ascites-Tumorzellen. *Arzneim.-Forsch.* 13, 1034 (1963)
- PELC, S.R., T.C.APPLETON: Distribution of Tritiated Thymidine in Various Tissues. *Nature* 205, 1287 (1965)
- POST, J., J.HOFFMAN: Some Effects of Tritiated Thymidine as a DNA Label in the Rat Liver. *Rad.Res.* 14, 713 (1961)
- POTEL, J., N.BROCK: Die Beeinflussung immunologischer Reaktionen durch cancerotoxische Substanzen. *Arzneim.-Forsch.* 15, 659 (1965)
- RAUEN, H.M., K.NORPOTH: Die biologische 'Aktivierung' von Endoxan. *Naturwissenschaften* 52, 477 (1965)
- RUTMAN, R.J.: Comparisons of the Distribution and Retention of Ring-Labeled ^{14}C -Cytosine and ^{14}C -HN2 in Mice.

- In: H.Wilmanns: Chemotherapie
maligner Tumoren, Schattauer
Stuttgart 1964
- Samuels, L.D., W.E.KISIELESKI: Toxicological Studies of Tritiated Thymidine.
Rad.Res. 18, 620 (1963)
- SCHUMACHER, K.: Grenzen der Chemotherapie maligner Tumoren. Med.Welt 64, 2541 (1964)
- SCHUMACHER, K., J.LANGE: Die zytostatische Therapie der malignen Tumoren mit alkylierenden Substanzen. Dtsch.Med.J. 15, 761 (1964)
- SMELLIE, R.M.S., E.D.GRAY, H.M.KEIR, J.RICHARDS, D.BELL, J.N.DAVIDSON: Studies on the Biosynthesis of DNA by Extracts of Mammalian Cells. Biochim.Biophys.Acta 37, 243 (1960)
- SMELLIE, R.M.S., H.M.KEIR, J.N. DAVIDSON: Studies on the Biosynthesis of DNA by Extracts of Mammalian Cells. Biochim.Biophys.Acta 35, 389 (1959)
- STEEL, G.G., L.F.LAMERTON: The Turnover of Tritium from Thymidine in Tissues of the Rat. Exp.Cell Res. 37, 117 (1965)
- STENDER, H.S.: Milz und Lymphknoten. In:E.Scherer, H.S.Stender: Strahlenpathologie der Zelle, Georg Thieme Stuttgart 1963
- STENDER, H.S.: Diskussion S.167. In: H.Wilmanns: Chemotherapie maligner Tumoren, Schattauer Stuttgart 1964

- STENDER, H.S., D.STRAUCH, H.WINTER: Vergleichende Untersuchungen über die Behinderung der Antikörperbildung durch Röntgenstrahlen und einen N-Lost-Phosphamidester. Strahlentherapie 115, 175 (1961)
- STENDER, H.S., D.STRAUCH, H.WINTER, W.TEXTOR: Die Wirkung des Cyclophosphamids bei fraktionierter oder massierter Dosierung auf die Antikörperbildung. Arzneim.-Forsch. 13, 1031 (1963)
- STOHLMANN, F.: The Kinetics of Cellular Proliferation, Grune & Stratton New York-London 1959
- STONE, G.E., O.L.MILLER, D.M.PRESCOTT: ^3H -Thymidine Derivative Pools in Relation to Macronuclear DNA Synthesis in Tetrahymena pyriformis. J.Cell Biol. 25, 171 (1965)
- VERLEY, W.G., H.FIRKET, G.HUNEBELLE: Preparation of Tritium-Labelled Thymidine and its Use for Study, by the Autoradiographic Method, of the Synthesis of DNA in Culture Cells. Un.Nat.Int.Conf.on the Peaceful Use of Atomic Energy, New York 1958
- WATSON, M.L.: Molecular Structure of Nucleic Acids. Nature 171, 737 (1953)
- WEIDEL, W.: Biochemie genetisch aktiver Substanzen. In: Physiol.Chemie II, 2c, Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959

- WEISSMAN, S.M., E.D.GRAY, R.Y.THOMSON, R.M.S.
SMELLIE, J.N.DAVIDSON:
Factors Controlling the Enzymic
Synthesis of DNA. Biochem. J. 76,
26P (1960)
- WEISSMAN, S.M., J.PAUL, R.Y.THOMSON, R.M.S.SMELLIE,
J.N.DAVIDSON:
Thymidine Kinases in Mammalian
Tissues. Biochem.J. 76, 1P,
(1960)
- WEISSMAN, S.M., R.M.S.SMELLIE, J.PAUL: Studies on
the Biosynthesis of Deoxyribonu-
cleic Acid by Extracts of Mamma-
lian Cells. IV.The Phosphorylation
of Thymidine. Biochim.Biophys.
Acta 45, 101 (1960)
- WIMBER, D.E.: Chromosome Breakage Produced by
Tritium-Labeled Thymidine in Trades-
cantia paludosa. Proc.of the Nat.
Acad.of Sciences of the USA 45,
839 (1959)
- ZAJICEK, G., J.GROSS: Studies on the Radiobiological
Effect of ^3H -Thymidine on the DNA
Turnover in Landschütz Ascites
Tumour Cells. Exp.Cell Res. 34,
138 (1964)

Mein Dank gilt Prof.Dr.med. Dr.rer.nat.
E.H. Graul für die Überlassung des Themas
und Herrn Priv.Doz.Dr. E. Schaumlöffel für
die freundliche Unterstützung bei der Zu-
sammenstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 22. Januar 1940 wurde ich in Leipzig geboren. Meine Eltern übersiedelten 1942 nach Oberschlesien, von wo wir 1945 als Vertriebene nach Leipzig zurückkehrten. Von 1946 bis 1949 besuchte ich in Leipzig die Grundschule, bis Herbst 1950 in Berlin-Schöneberg die Volksschule, anschließend in Frankfurt/Main die Weidenborn-Mittelschule und ab Frühjahr 1954 in Wiesbaden die Helenê-Lange-Schule, Realgymnasium für Mädchen, wo ich Ostern 1959 mein Abitur bestand.

Nach dreisemestrigem Mathematikstudium begann ich ab Wintersemester 60/61 in Frankfurt/Main Medizin zu studieren. Nach dem Sommersemester 61 machte ich das Vorphysikum und setzte mein vorklinisches Studium ab Sommersemester 62 in Erlangen fort, wo ich es mit der ärztlichen Vorprüfung nach dem Wintersemester 63/64 abschloß.

Zum Sommersemester 1964 kam ich nach Marburg und begann im Frühjahr 1967 mit dem Staatsexamen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten

in Frankfurt/M. : Czerny, Egle, Dänzer, Frick,
Giersberg, Heinz, Müser, Ortmann,
Ried, Royen, Starck, Wezler, Wieland.

in Erlangen : Bauer, Keidel, Haug, Leonhardt,
May.

in Marburg : Beckmann, Berendes, Braun-Falco,
Bommer, Buchholz, Cleve, Delbrück,
Deicher, Dölle, Exner, Falke, Ganz,
Gedigk, Hamm, Heuser, Hildebrandt,
Jacob, Knauff, Lang, Linneweh,
Lübbers, Mann, Martini, Marx, du
Mesnil de Rochemont, Neubauer,
Poetschke, Rohen, Schiff, Schleyer,
W. Schmid, F.W. Schmidt, Schürmann,
Schwaiger, Siegert, Siess, Straub,
Streicher, Würtele.

